

Sete Lagoas, MG
Setembro, 2010

Autores

Janaína de Oliveira Melo
Doutoranda em Genética
UFMG, Embrapa Milho e
Sorgo, Sete Lagoas, MG

Ubiraci Gomes de Paula Lana
Químico, Doutorando em
Genética, Analista da Em-
brapa Milho e Sorgo, Sete
Lagoas, MG. ubiraci@cnpm-
embrapa.br

Cláudia Teixeira Guimarães
Engenheira-Agrônoma,
Ph.D. em Biologia Molecular,
Pesquisadora da Embrapa
Milho e Sorgo, Sete Lagoas,
MG, claudia@cnpm-
embrapa.br

Robert Eugene Schaffert
Engenheiro-Agrônomo, Doutor
em Genética e Melhoramento
de Plantas, Pesquisador da
Embrapa Milho e Sorgo,
Sete Lagoas, MG. schaffert@
cnpm-embrapa.br

Veridiana Soares Pereira Cano
D.S., Applied Biosystems

Jurandir Vieira de Magalhães
Engenheiro-Agrônomo,
Ph.D. em Biologia Molecular,
Pesquisador da Embrapa
Milho e Sorgo, Sete
Lagoas, MG, jurandir@
cnpm-embrapa.br. Autor
Correspondente.

Desenvolvimento de Um Ensaio de Discriminação Alélica para Caracterização de Fatores Regulatórios Envolvidos com a Expressão do Gene de Tolerância ao Alumínio SbMATE em Sorgo

Tolerância ao alumínio em sorgo

O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) é o quinto cereal mais produzido no mundo (FAO, 2008). Seus grãos são utilizados na alimentação humana e, no Brasil, destinam-se à alimentação animal. Além disso, ele é fonte de matéria-prima para produção de bebidas alcoólicas, de biocombustíveis e extração de açúcar. O sorgo apresenta várias características interessantes para pesquisa genômica em gramíneas, como um genoma relativamente pequeno e pouco duplicado e alta tolerância aos estresses abióticos. Com o advento do sequenciamento completo do genoma do sorgo (PATERSON et al., 2009), há enorme potencial para a sua utilização para acelerar a descoberta de genes de interesse agrônomo.

A toxidez causada pelo alumínio é um dos fatores mais limitantes à produtividade agrícola em solos ácidos com pH inferior a 5,0. Nesses solos, formas iônicas do alumínio danificam o sistema radicular das plantas, inibindo drasticamente o crescimento e contribuindo para a baixa produtividade agrícola (DELHAIZE; RYAN, 1995).

A tolerância ao Al em sorgo deve-se em grande parte ao loco Alt_{SB} , que foi mapeado no cromossomo 3 (MAGALHÃES et al., 2004). O gene que determina a tolerância ao Al, denominado *SbMATE*, foi isolado via clonagem posicional, e codifica uma proteína da família MATE (*Multidrug and toxic compound extrusion family*), um transportador de membrana responsável pela liberação de citrato, cuja expressão, induzida pelo Al, é maior nos ápices radiculares (MAGALHÃES et al., 2007). Foi também identificada uma série alélica no loco Alt_{SB} que resulta em uma variação expressiva na tolerância ao Al em diferentes genótipos de sorgo. Além disso, também foi verificada uma redução da tolerância ao Al em duas linhagens isogênicas para o referido loco em comparação com as linhagens parentais, e a presença de fatores genéticos distintos ao gene *SbMATE*, que controlam a tolerância ao Al em sorgo (CANIATO et al., 2007).

Regulação da expressão do gene *SbMATE* em sorgo

Trabalhos de mapeamento de alta resolução definiram o loco Alt_{SB} em uma região de 24,6 kpb (kilo pares de bases) no cromossomo 3 de sorgo. Essa região contém três sequências abertas de leitura (*open reading frame*, ORF), sendo que uma delas corresponde ao gene *SbMATE*. O sequenciamento dessa região mostrou que a região codificadora do gene *SbMATE* é idêntica entre os parentais tolerante (SC283) e sensível (BR007), apresentando polimorfismos apenas no segundo intron, sendo eles seis SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) e uma inserção/deleção (indel). Além disso, foi encontrada uma região altamente variável próxima ao promotor do gene *SbMATE*, cujos polimorfismos são causados por inserções/

deleções de um transposon do tipo MITE (*Miniature Inverted Transposable Element*) (BUREAU; WESSLER, 1992; WESSLER et al., 1995). No painel de sorgo utilizado por CANIATO et al. (2007), variações alélicas no tamanho da inserção foram significativamente correlacionadas com a tolerância ao alumínio (MAGALHÃES et al., 2007). Isso sugere que os polimorfismos causativos da tolerância ao Al estão localizados em regiões regulatórias fora da sequência codificadora do gene, que agem para aumentar a expressão gênica no ápice da raiz.

Mais recentemente, foi identificada outra fonte de tolerância ao Al, SC566, que mostrou a maior taxa de exsudação de citrato ativada por Al dentre as linhagens estudadas até o momento, resultando em alta tolerância ao Al. Esta linhagem apresentou uma mutação do tipo polimorfismo de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP – A/T) no primeiro exon do gene (LANA, 2007). Adicionalmente, a expressão do gene *SbMATE* nessa linhagem é superior aos padrões até então observados entre as linhagens de sorgo. Assim, torna-se razoável a expectativa de que elementos regulatórios, como fatores de transcrição, estejam ativos em SC566, sendo responsáveis pelos altos níveis de expressão gênica observados nessa linhagem. No presente trabalho, o SNP detectado em SC566 foi utilizado para o desenvolvimento de um ensaio alelo-específico de expressão do gene *SbMATE*. Esse ensaio permite estudar a expressão, de maneira simultânea, dos dois alelos presentes em estoques híbridos, permitindo elucidar os mecanismos moleculares de ação gênica no loco *Alt_{SB}*, bem como a natureza em *cis* ou *trans* dos efeitos regulatórios a que está submetido o gene *SbMATE*.

Desenvolvimento do ensaio Alelo-específico do gene *SbMATE*

A *TaqMan MGB Allelic Discrimination* (Applied Biosystems) é uma metodologia de discriminação alélica que tem sido utilizada em vários trabalhos. Neste tipo de análise é realizada uma genotipagem com base em um ensaio que utiliza sondas alelo-específicas marcadas com fluorescência.

O ensaio para a discriminação dos alelos do gene *SbMATE* foi realizado em caráter inovador, pois combinou a metodologia *TaqMan* de expressão

gênica avaliada por meio de RT-PCR quantitativo juntamente com a discriminação alélica por meio de sondas *TaqMan Allelic Discrimination* no equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems).

O ensaio alelo-específico foi baseado no SNP do tipo A/T existente no primeiro exon do gene *SbMATE*, que diferencia o alelo da linhagem SC566 das demais linhagens. Assim, utilizando-se o *software Primer Express 3.0* (Applied Biosystems) com a opção *TaqMan Allelic Discrimination*, foi desenhado um par de *primers* que flanqueiam o SNP e um par de sondas, cada uma específica para um dos alelos do SNP. As sondas são do tipo TAMRA, marcadas com a fluorescência 6-FAM e foram utilizadas nas reações separadamente. As sequências das sondas utilizadas estão em fase de publicação e serão disponibilizadas brevemente para o caso do gene *Alt_{SB}*. Entretanto, o propósito dessa circular é o de indicar os ajustes necessários para viabilizar a utilização da tecnologia *Taq-Man* para ensaios de expressão alelo-específicos. Dessa maneira, os ajustes deverão ser feitos caso a caso com base nas informações aqui expostas, com base nas sondas específicas para os genes de interesse.

Discriminação alélica do gene *SbMATE*

Testes com diferentes concentrações de *primers* e sondas

O primeiro centímetro dos 28 ápices radiculares de cada genótipo foram coletados e o RNA total foi extraído utilizando o kit RNeasy Plant Mini (Qiagen, Valencia, CA, USA), segundo recomendações do fabricante, e tratado com 10U da enzima DNase I, RNase-free (Qiagen, Valencia, CA, USA) durante o procedimento de extração por 15 min à temperatura ambiente. As amostras foram quantificadas e a pureza do RNA verificada por meio de leitura a 260 e 280 nm utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 3000 (Thermo Fisher Scientific, Worcester, MA). A verificação da integridade do RNA foi feita por eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 1x, contendo 0,25 µg/mL de brometo de etídeo. A eletroforese foi realizada a 200V por 15 min e o gel visualizado no sistema de fotodocumentação Kodak Gel Logic 200 Imaging System® (Carestream, Health, New Haven, CT). Para obtenção do cDNA, foi utilizado o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied

Biosystems, Foster City, CA). A reação de síntese do cDNA foi efetuada para um volume final de 20 μ L, utilizando 2 μ g de RNA total, RT Random *primers* e Transcriptase Reversa. As condições de amplificação foram 25°C por 10 min, 37°C por 2h e 85°C por 5 min.

As condições de amplificação do ensaio de expressão para a discriminação dos diferentes alelos do gene *SbMATE* foram otimizadas de maneira a minimizar possíveis reações cruzadas no híbrido, garantindo assim a especificidade do ensaio. O sinal cruzado é definido como o sinal proveniente de uma sonda desenhada para um dado alelo em indivíduos expressando o alelo alternativo do gene *SbMATE*. Assim sendo, cada linhagem foi hibridizada com duas sondas *TaqMan*. Considerando-se que cada linhagem de sorgo possui somente um dos alelos em homozigose, o sinal obtido com a sonda desenhada para o alelo alternativo, que não está presente na linhagem analisada, constitui o sinal cruzado.

Inicialmente, vários testes foram realizados variando-se as concentrações dos *primers* e das sondas para otimizar a discriminação alélica. As linhagens usadas nestes testes foram BR012 e SC283, que apresentam o alelo T, e a linhagem SC566, que possui o alelo A. A reação *TaqMan* para a quantificação relativa dos alelos foi efetuada primeiramente com uma concentração de 100 η M dos *primers*, sendo testadas três concentrações das sondas, 50, 150, e 250 η M. Essas concentrações das sondas também foram testadas juntamente com as concentrações finais de *primers* de 500 e 900 η M. Para cada linhagem foram feitas duas reações, sendo uma para cada sonda. Foram adicionados 5 μ L do cDNA (diluído 10x) e 10 μ L do *TaqMan Universal PCR Master Mix* 2x (Applied Biosystems) para um volume final de 20 μ L. O controle endógeno foi o RNA ribossômico 18S nas seguintes condições: 1 μ L de *20x Expression Assay Mix* 18S (Applied Biosystems), 10 μ L de *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) e 5 μ L do cDNA (diluído 10.000x) para um volume final de 20 μ L. Outros testes foram realizados mantendo-se a concentração de *primers* a 500 η M e alterando-se as concentrações das sondas para 30 e 20 η M, seguindo a idéia de que uma diminuição na concentração da sonda deveria resultar em um aumento de especificidade do ensaio.

Após vários testes, verificou-se que a melhor concentração dos *primers* foi a de 500 η M. Utilizando-se as sondas em concentrações maiores do que 50 η M e os *primers* em concentrações diferentes de 500 η M, foram encontrados resultados que mostraram uma diferença na expressão entre o sinal específico e inespecífico de aproximadamente 3 vezes (dados não apresentados). Quando a concentração dos *primers* de 500 η M e a das sondas de 50 η M foi usada, observou-se uma diferença na expressão do alelo A da linhagem SC566 de 6 vezes em relação ao sinal cruzado. O alelo T das linhagens BR012 e SC283 apresentou expressão de aproximadamente 13 e 16 vezes maior do que o sinal cruzado dessas linhagens, respectivamente (Figura 1a). Porém, o melhor resultado, aquele que mais discriminou os alelos, foi aquele utilizando-se a sonda a 20 η M e os *primers* a 500 η M. Nessa condição, o sinal específico foi 44 vezes maior do que o inespecífico na linhagem SC566, 49 vezes na linhagem BR012 e 146 vezes na linhagem SC283 (Figura 1b).

Com as condições das reações otimizadas, foi realizado um ensaio com as linhagens BR012, SC283 e SC566, onde a expressão de cada alelo foi normalizada pelo seu sinal cruzado (i.e. a linhagem que expressa o alelo T foi normalizada pelo sinal cruzado, obtido pela sonda A) (Figura 2). De acordo com o resultado mostrado na Figura 2, uma maior expressão do alelo presente em cada uma das linhagens foi detectada com o ensaio alelo específico. Portanto, o sinal específico foi substancialmente maior do que o inespecífico em todos os casos. Dessa maneira, torna-se possível a utilização desse ensaio em estoques híbridos com a finalidade de quantificar simultaneamente a expressão de cada alelo do gene *SbMATE* e, portanto, suas contribuições para a tolerância ao Al em sorgo.

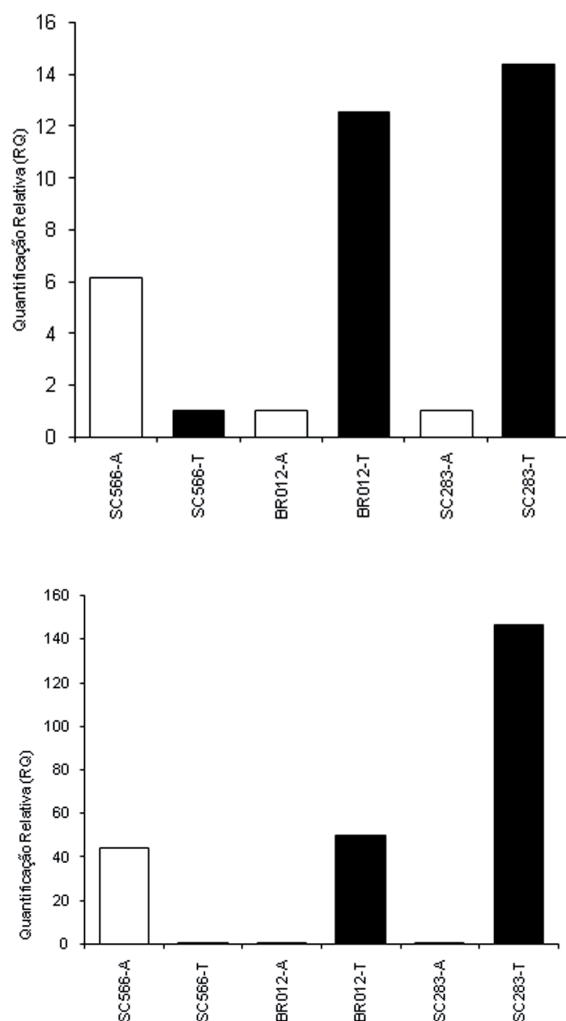


Figura 1. Análise de expressão alelo-específica do gene *SbMATE* baseada no SNP T/A. As linhagens BR012 e SC283 possuem o alelo T, enquanto a linhagem SC566 apresenta o alelo A. SC566-A, BR012-A e SC283-A representam a expressão obtida com a sonda A (barras brancas) e SC566-T, BR012-T e SC283-T representam a expressão obtida com a sonda T (barras pretas). Para cada linhagem, os resultados foram normalizados pelo sinal cruzado (e.g. SC566-T foi utilizado para normalizar os resultados obtidos com SC566-A; portanto, a expressão específica do alelo A na linhagem SC566 foi aproximadamente 40 vezes o sinal inespecífico, SC566-T). Na Figura 1a, estão mostrados os resultados com as sondas na concentração de 500 ηM de *primers*. Na Figura 1b, está o resultado utilizando as sondas a 20 ηM e os *primers* na concentração de 500 ηM.

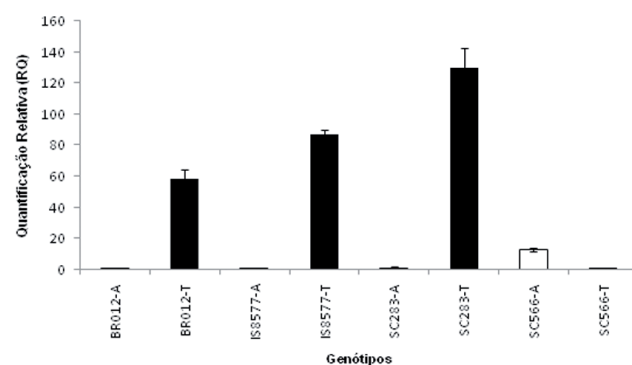


Figura 2. Discriminação alélica do gene *SbMATE* utilizando o ensaio *TaqMan*. A normalização foi feita com o sinal cruzado dos alelos de cada linhagem. As barras brancas representam resultado da expressão das reações efetuadas com a sonda alelo A e as barras pretas representam as reações efetuadas com a sonda alelo T. A e T após a designação da linhagem indicam a sonda utilizada para a análise de expressão. Foram adotadas três repetições técnicas.

Aplicações e perspectivas

As evidências indicam que a base molecular dos efeitos alélicos no loco *Alt_{SB}* são polimorfismos em regiões regulatórias que afetam a expressão do gene *SbMATE*. Além disso, evidências recentes indicam a ocorrência de efeitos de *background* genético afetando a expressão do gene *Alt_{SB}* e, portanto, a tolerância ao Al em sorgo.

O ensaio alelo-específico desenvolvido neste trabalho será utilizado na quantificação específica dos diferentes alelos expressos em estoques híbridos gerados pelos cruzamentos da linhagem SC566 com outras linhagens de sorgo.

A definição da natureza molecular dos efeitos regulatórios será fundamental para o futuro isolamento desses fatores. Isso permitirá a formulação de estratégias avançadas de melhoramento molecular da tolerância ao Al em sorgo visto que níveis máximos de tolerância podem ser alcançados pela combinação de alelos favoráveis no loco *Alt_{SB}* com aqueles de locos regulatórios localizados em posições ainda não determinadas.

Referências

BUREAU, T. E.; WESSLER, S. R. Tourist: a large family of small inverted repeat elements frequently associated with maize genes. **The Plant Cell**, Rockville, v. 4, p. 1283-1294, 1992.

CANIATO, F. F.; GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; ALVES, V. M.; KOCHIAN, L. V.; BORÉM, A.; KLEIN, P. E.; MAGALHÃES, J. V. Genetic diversity for aluminum tolerance in sorghum. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 114, p. 863-876, 2007.

DELHAIZE, E.; RYAN, P. R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 107, p. 315-321, 1995.

FAO. Statistical database. 2008. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx>>. Acesso em: jul. 2010.

LANA, U. G. P. **Caracterização molecular do gene de tolerância ao alumínio Alt_{sb} em sorgo**. 2007. 65 p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MAGALHÃES, J. V.; LIU, J.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G. P.; ALVES, V. M. C.; WANG, Y. H.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; KLEIN, P. E.; CARNEIRO, N. P.; COELHO, C. M.; TRICK, H. N.; KOCHIAN, L. V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v. 39, p. 1156-1161, 2007.

MAGALHÃES, J. V.; GARVIN, D. F.; WANG, Y.; SORRELLS, M. E.; KLEIN, P. E.; SCHAFFERT, R. E.; LI, L.; KOCHIAN, L. V. Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. **Genetics**, Maryland, v. 167, p. 1905-1914, 2004.

PATERSON, A. H.; BOWERS, J. E.; BRUGGMANN, R.; DUBCHAK, I.; GRIMWOOD, J.; GUNDLACH, H.; HABERER, G.; HELLSTEN, U.; MITROS, T.; POLIAKOV, A.; SCHMUTZ, J.; SPANNAGL, M.; TANG, H.; WANG, X.; WICKER, T.; BHARTI, A. K.; CHAPMAN, J.; FELTUS, F. A.; GOWIK, U.; GRIGORIEV, I. V.; LYONS, E.; MAHER, C. A.; MARTIS, M.; NARECHANIA, A.; OTILLAR, R. P.; PENNING, B. W.; SALAMOV, A. A.; WANG, Y.; ZHANG, L.; CARPITA, N. C.; FREELING, M.; GINGLE, A. R.; HASH, C. T.; KELLER, B.; KLEIN, P.; KRESOVICH, S.; McCANN, M. C.; MING, R.; PETERSON, D. G.; RAHMAN, M.-U.; WARE, D.; WESTHOFF, P.; MAYER, K. F. X.; MESSING, J.; ROKHSAR, D. S. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. **Nature**, London, v. 457, p. 551-556, 2009.

WESSLER, S. R.; BUREAU, T. E.; WHITE, S. E. LTR-retrotransposons and MITEs: important players in the evolution of plant genomes. **Current Opinion in Genetics and Development**, London, v. 5, p. 814-821, 1995.

Circular Técnica, 153

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Endereço: Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027 1100
Fax: (31) 3027 1188
E-mail: sac@cnpmis.embrapa.br
1ª edição
1ª impressão (2010): on line

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê de Publicações

Presidente: Antônio Carlos de Oliveira.
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau.
Membros: Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana, João Herbert Moreira Viana, Guilherme Ferreira Viana e Rosângela Lacerda de Castro.

Supervisão editorial: Adriana Noce.
Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros.

Expediente

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro.
Tratamento das ilustrações: Tânia Mara A. Barbosa.
Editoração eletrônica: Tânia Mara A. Barbosa.